

**PENGARUH PEMBERIAN MINYAK BIJI KELOR
(*Moringa oleifera*) TERHADAP EKSPRESI TGF- β
(*TRANSFORMING GROWTH FACTOR* β) DAN
JUMLAH SEL FIBROBLAS PADA TERAPI
LUKA INSISI HEWAN MODEL TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Oleh:

GABRIELA HENDRA FIORENTINA

145130100111043



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**PENGARUH PEMBERIAN MINYAK BIJI KELOR
(*Moringa oleifera*) TERHADAP EKSPRESI TGF- β
(*TRANSFORMING GROWTH FACTOR β*) DAN
JUMLAH SEL FIBROBLAS PADA TERAPI
LUKA INSISI HEWAN MODEL TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

GABRIELA HENDRA FIORENTINA
145130100111043



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN MINYAK BIJI KELOR (*Moringa oleifera*) TERHADAP EKSPRESI TGF- β (*TRANSFORMING GROWTH FACTOR β*) DAN JUMLAH SEL FIBROBLAS PADA TERAPI LUKA INSISI HEWAN MODEL TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)

Oleh:

GABRIELA HENDRA FIORENTINA

NIM. 145130100111043

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal....
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Dr. Masdiana C. Padaga, drh., M.App.Sc

NIP. 19560210 198403 2 001

drh. Dyah Ayu Oktavianie., M.Biotech

NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Gabriela Hendra Firoentina

NIM : 145130100111043

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Minyak Biji Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Ekspresi TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) dan Jumlah Sel Fibroblas pada Terapi Luka Insisi Hewan Model Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, makasaya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,

Yang menyatakan,

Gabriela Hendra Fiorentina

NIM. 145130100111043

**Pengaruh Pemberian Minyak Biji Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap
Ekspresi TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) dan Jumlah
Sel Fibroblas pada Terapi Luka Insisi Hewan
Model Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)**

ABSTRAK

Luka insisi adalah rusaknya atau hilangnya kesatuan jaringan atau sebagian komponen jaringan karena teriris oleh benda tajam. Minyak biji kelor memiliki kandungan flavonoid yang berkemampuan sebagai anti-inflamasi, antioksidan dan antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian minyak biji kelor (*Moringa oleifera*) terhadap peningkatan ekspresi TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) dan jumlah sel fibroblas. Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih *strain wistar* jantan umur 8-12 minggu, berat badan 150-250 gram yang dibagi dalam 5 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif (sehat), kontrol positif, kelompok perlakuan terapi minyak biji kelor dengan konsentrasi bertingkat 50%, 75%, dan 100% pada daerah luka insisi. Terapi diberikan sehari dua kali selama 7 hari dan tikus dieuthanasi pada hari ke-8. Ekspresi TGF- β diamati dengan metode Imunohistokimia dan jumlah fibroblas diamati dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin. Analisa data dilakukan secara kuantitatif dengan *One Way ANOVA* dan uji lanjutan Tukey ($\alpha=0,05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian terapi minyak biji kelor secara signifikan dapat meningkatkan jumlah sel fibroblas dan ekspresi TGF- β dengan dosis efektif sebesar 75%. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu pemberian minyak biji kelor dapat digunakan sebagai terapi alternatif untuk penyembuhan luka insisi

Kata kunci: Luka Insisi, Minyak Biji Kelor, TGF- β , Fibroblas

The Effect of Kelor Seed Oil (*Moringa oleifera*) as Therapy of Incision Wound towards TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*) Expression and Number of Fibroblast Cells on White Rats (*Rattus norvegicus*)

ABSTRACT

An incision wound is the breakdown or loss of a unified tissue or part of a tissue component due to a sharp cut. Moringa seed oil contained flavonoid which has the ability as anti-inflammatory, antioxidants and antimicrobials. The purpose of this study was to know about administration effect of *Moringa oleifera* oil to increase the expression of TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) and the number of fibroblast cells. This research was an experimental research used Completely Randomized Design. Animal models that were used in this study consisted of male wistar rats aged 8-12 weeks old and weighed around 150-250 grams. Rats were divided into 5 treatment groups consisted of negative control group, positive control group, and treatment group of Moringa seed oil therapy with concentration of stratified 50%, 75%, and 100%. Treatment was administered twice daily for 7 days and the rats were euthanized on day 8. The expression of TGF- β was observed by Immunohistochemistry methods and the amount of fibroblasts were stained by Hematoxylin Eosin. Expression of TGF- β and the number of fibroblast were measured quantitatively and analyzed by *One Way ANOVA* and followed by Tukey test ($\alpha = 0,05$). The results of this study showed that moringa seed oil therapy could significantly increase the number of fibroblast cells and TGF- β expression with an effective dosage of 75%. The conclusion of this study was moringa seed oil could be used as an alternative therapy of incision wound.

Key words: *Incision wounds, Moringa seed oil, TGF- β , Fibroblast*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala rahmat dan nikmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Pemberian Minyak Biji Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Ekspresi TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*) dan Jumlah Sel Fibroblas pada Terapi Luka Insisi Hewan Model Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) ”**. Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Universitas Brawijaya.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih khususnya kepada:

1. Dr. Masdiana C. Padaga, drh., M.App.Sc, selaku dosen pembimbing I atas segala bantuan, bimbingan, kesabaran, nasihat, waktu dan arahan yang diberikan tiada henti kepada penulis.
2. drh. Dyah Ayu Oktavianie., M.Biotech., selaku dosen pembimbing II atas segala bantuan, bimbingan, kesabaran, nasihat, waktu dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
3. drh. Ajeng Erika PH, M.Si. dan drh. M. Arfan. Lesmana, M.Sc. sebagai dosen penguji I dan II yang telah meluangkan waktu serta memberikan masukan dan saran yang membangun.
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya (FKH UB) atas kepemimpinan dan dukungan demi kemajuan FKH UB.
5. Keluarga penulis, Papa Hendro, Mama Mia, dan Koko Bas yang terus memberikan doa, motivasi, kasih sayang serta materi kepada penulis.
6. Nurhaya, Mitra, dan Windy selaku tim Moringa yang memotivasi, memberikan dukungan dan berjuang bersama.

7. Melinda, Malinda, Gaviota, Iva, Dena, Robbie atas segala dukungan, bantuan dan doa yang tidak akan terlupakan.
8. Gerry Prima Rizky yang selalu memberikan motivasi dan menghibur dalam pembuatan skripsi
9. Partner unik nan spesial penulis, Nadila Aztizar, Hanifa Pramana, dan Naadiyah WP
10. Teman-teman DEER dan AVENGERS yang selalu memberikan bantuan tenaga dan pikiran.
11. Rekan Asisten Fisiologi, Parasitologi, dan Bedah Veteriner yang selalu memberikan ilmu, motivasi dan keceriaan.
12. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan proposal ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini penulis merasa masih banyak kekurangan pada teknis penulisan maupun materi, mengingat akan kemampuan yang dimiliki penulis. Skripsi ini masih jauh dari kata sempurna sehingga diharapkan dapat memberikan masukan dari berbagai pihak untuk penulisan yang lebih baik. Semoga tugas akhir ini dapat memberikan manfaat karena pengalaman adalah guru terbaik.

Malang, Desember 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kulit	6
2.2 Luka Insisi.....	9
2.3 Fase Penyembuhan Luka	9
2.3.1 Fase Hemostasis	10
2.3.2 Fase Inflamasi.....	11
2.3.3 Fase Proliferasi	11
2.3.4 Fase Maturasi.....	12
2.4 Ekspresi TGF- β pada Penyembuhan Luka Insisi.....	12
2.5 Fibroblas pada Penyembuhan Luka Insisi	13
2.6 Minyak Biji Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) sebagai Antiinflamasi....	15
2.7 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Luka Insisi	17
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN	19
3.1 Kerangka Konseptual.....	19
3.2 Hipotesis Penelitian	22
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	23
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	23
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	23

4.3 Tahapan Penelitian	24
4.3.1 Rancangan penelitian	24
4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian	25
4.3.3 Variabel Penelitian	26
4.4 Prosedur kerja.....	26
4.4.1 Persiapan Hewan Coba	26
4.4.2 Pembuatan Luka Insisi pada Hewan Coba.....	26
4.4.3 Terapi Minyak Biji Kelor.....	27
4.4.4 Euthanasi dan Isolasi Kulit	27
4.4.5 Perhitungan Jumlah Fibroblas.....	27
4.4.5.1 Pembuatan Preparat Histopatologi dan pewarnaan HE	27
4.4.6 Ekspresi TGF- β dengan Metode Immunohistokimia (IHK) ..	29
4.5 Analisis Data	30
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	31
5.1 Pengaruh Pemberian Minyak Biji Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Jumlah Sel Fibroblas pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Luka Insisi	31
5.2 Pengaruh Pemberian Minyak Biji Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Ekspresi TGF- β pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Luka Insisi	37
BAB VI PENUTUP	43
6.1 Kesimpulan	43
6.2 Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN.....	48

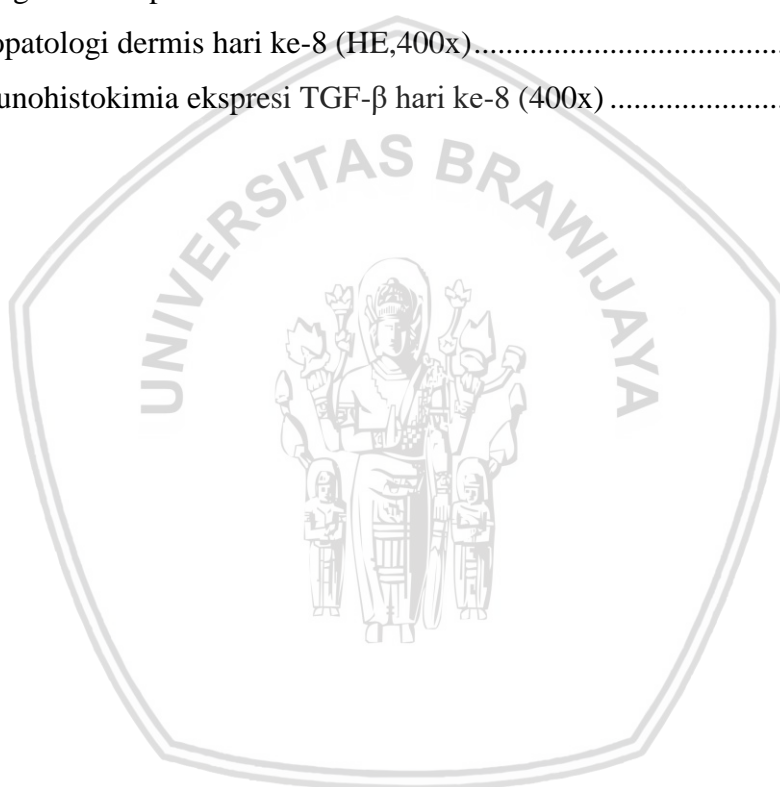
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Hasil perhitungan rata-rata jumlah sel fibroblas hari ke-8.....	32
5.2 Data ekspresi TGF- β hari ke-8.....	38



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Lapisan Kulit.....	6
2.2 Struktur Sel Fibroblas	14
2.2 Tanaman kelor.....	15
2.3 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Luka Insisi	17
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	19
5.1 Histopatologi dermis hari ke-8 (HE,400x).....	31
5.2 Immunohistokimia ekspresi TGF- β hari ke-8 (400x)	37



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik.....	49
2. Determinasi Tanaman Kelor	50
3. Skema Penelitian.....	51
4. Pengenceran dan Perhitungan Volume Obat Anastesi.....	52
5. Pembuatan Luka Insisi pada Hewan Coba.....	53
6. Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit.....	54
7. Metode Imunohistokimia	55
8. Metode Pembuatan Preparat dengan HE.....	56
9. Gambaran Makroskopis Luka Insisi	57
10. Data Jumlah Sel Fibroblas	58
11. Data Uji Stastistika Jumlah Sel Fibroblas.....	60
12. Data Jumlah Ekspresi TGF- β	62
13. Data Uji Statistika Ekspresi TGF- β	64

DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

Simbol/ Singkatan	Keterangan
%	: Persen
/	: per
°C	: Derajat celcius
ANOVA	: <i>Analysis of variance</i>
BB	: Berat Badan
BNF	: <i>Buffer Neutral Formalin</i>
Cm	: Centimeter
DAB	: Diamano benzidine
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FMIPA	: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
g	: Gram
HE	: Hematoksilin Eosin
IHK	: Imunohistokimia
IU	: <i>International Unit</i>
Kg	: Kilogram
m ²	: meter persegi
mg	: miligram
ml	: mililiter
mm	: milimeter
NaCl	: Natrium Klorida
Na ₂ SO ₄	: Natrium Sulfat
PBS	: <i>Phospat Buffer Saline</i>
PFA	: <i>Paraformaldehyd</i>
pH	: <i>Potensial Hidrogen</i>
PVP	: <i>polyvinylpyrrolidone</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SA-HRP	: <i>Strep Avidin Horse Radish Peroxidase</i>
TGF-β	: <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TNF-α	: <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
UPT	: Unit Pelaksana Teknis

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka merupakan suatu kondisi hilangnya struktur anatomis dan fungsi normal dari jaringan tubuh karena proses patologis, sehingga menimbulkan efek yang traumatis pada jaringan tubuh. Luka insisi terjadi karena teririsnya jaringan oleh benda tajam yang dapat diperoleh karena kecelakaan ataupun akibat prosedur pembedahan. Luka insisi akibat pembedahan menyebabkan perubahan hemodinamik, metabolik, dan imunologik. Gangguan sirkulasi, perubahan metabolisme, dan nutrisi yang kurang baik dapat menghambat penyembuhan luka sehingga beresiko menimbulkan komplikasi pada luka (Potter dan Perry, 2006).

Penyembuhan luka adalah suatu proses koordinasi yang melibatkan hubungan antara faktor seluler, humoral, dan unsur jaringan ikat untuk memperbaiki kerusakan jaringan agar dapat berfungsi kembali. Respon terhadap penyembuhan luka terdiri dari beberapa fase yaitu fase hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodelling. Fase awal yaitu fase hemostasis merupakan mekanisme untuk menghentikan perdarahan akibat luka. Selanjutnya yaitu fase inflamasi yang dimulai segera setelah terjadinya luka, bertujuan untuk menyingkirkan jaringan mati dan mencegah infeksi. Kemudian dilanjutkan dengan fase proliferasi, dimana akan terjadi keseimbangan antara pembentukan jaringan parut dan regenerasi jaringan. Fase terakhir adalah remodeling yang bertujuan untuk memaksimalkan kekuatan dan integritas struktural luka (Gurtner, 2007).

Fibroblas merupakan salah satu komponen penyembuhan luka yang berperan penting dalam fase proliferasi. Fibroblas terdistribusi secara luas di jaringan ikat, memproduksi substansi prekursor kolagen, jaringan elastis, dan jaringan retikuler. Fibroblas berperan penting dalam proses fibroplasia, yaitu proses proliferasi fibroblas yang ditandai oleh sintesis kolagen. Fungsi TGF- β juga berpengaruh secara positif terhadap fibroblas yaitu sebagai kemotaksis. Sifat dari kemotaksis antara lain menstimulasi proses terjadinya proliferasi, memproduksi ECM (Extracellular Matrix) pada proses proliferasi dan maturasi untuk membentuk kolagen dan fibronektin. Semakin tinggi TGF- β maka semakin tinggi proliferasi fibroblas, dimana fibroblas bertanggung jawab dalam mensintesis kolagen (Kristianto, 2010).

Pengobatan yang biasa diberikan untuk luka adalah dengan menggunakan larutan *normal saline* dan pemberian *povidone iodine* yang berperan sebagai antiseptik. *Povidone iodine* mengandung iodine bebas dan *polyvinylpyrrolidone* (PVP) yang memiliki efek antimikroba kuat, namun bahan ini bersifat toksik terhadap fibroblas dan leukosit, menghambat migrasi netrofil, dan menurunkan umur sel monosit. Penggunaan *povidone iodine* juga menghambat penyembuhan luka dan menimbulkan parut yang secara klinis lebih jelek (Triyono, 2006).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, adanya efek samping akibat penggunaan *povidone iodine* untuk penyembuhan luka, maka pengobatan yang berasal dari bahan alami seperti minyak biji kelor diharapkan dapat mempercepat fase inflamasi, memicu fase proliferasi dan meningkatkan fase fibroplasia. Dalam penelitiannya, Gopalakrishnan (2016) menyatakan bahwa

setiap bagian tanaman kelor memiliki kandungan nutrisi penting yang bermanfaat untuk pengobatan. Biji kelor mengandung flavonoid yang merupakan senyawa anti-inflamasi, antibiotik pterigospermin yang berfungsi sebagai senyawa antimikroba, dan senyawa fitokimia lainnya seperti tannin, saponin, fenol, terpenoid, lectin serta beberapa vitamin yang membantu dalam penyembuhan berbagai penyakit.

Efek antiinflamasi dari flavonoid diharapkan dapat meningkatkan ekspresi TGF- β untuk menginduksi proliferasi fibroblas dalam penyembuhan luka. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian minyak biji kelor terhadap proses kesembuhan luka insisi, khususnya pada ekspresi TGF- β dan jumlah fibroblas yang berperan dalam membantu penyembuhan luka pasca luka insisi

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut:

1. Apakah pemberian minyak biji kelor secara topikal dapat berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi TGF- β berkaitan dengan penyembuhan luka insisi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*)?
2. Apakah pemberian minyak biji kelor secara topikal dapat berpengaruh terhadap peningkatan jumlah fibroblas berkaitan dengan penyembuhan luka insisi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*)?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *wistar* umur 8-12 minggu dengan berat badan 150-250 g. Penggunaan hewan model dalam penelitian telah mendapatkan sertifikat laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 863-KEP-UB (**Lampiran 1**).
2. Luka insisi dibuat dengan menginsisi pada daerah punggung sejajar dengan os vertebrae thoracalis hingga os vertebrae lumbalis menggunakan scalpel-blade sepanjang 2 cm (Rairisti, 2014).
3. Pemberian terapi minyak biji kelor (*Moringa Olifera*) yang dilakukan secara topikal sebanyak 50 μ L pemberian dua kali sehari (Mori, 2016), dengan konsentrasi berbeda yaitu 50%, 75% dan 100% (Wajdi, 2017).
4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi TGF- β dan jumlah Fibroblas pada jaringan kulit. Pengamatan TGF- β diukur menggunakan metode IHK dan jumlah Fibroblas dengan pembuatan preparat histopatologi serta pewarnaan HE.

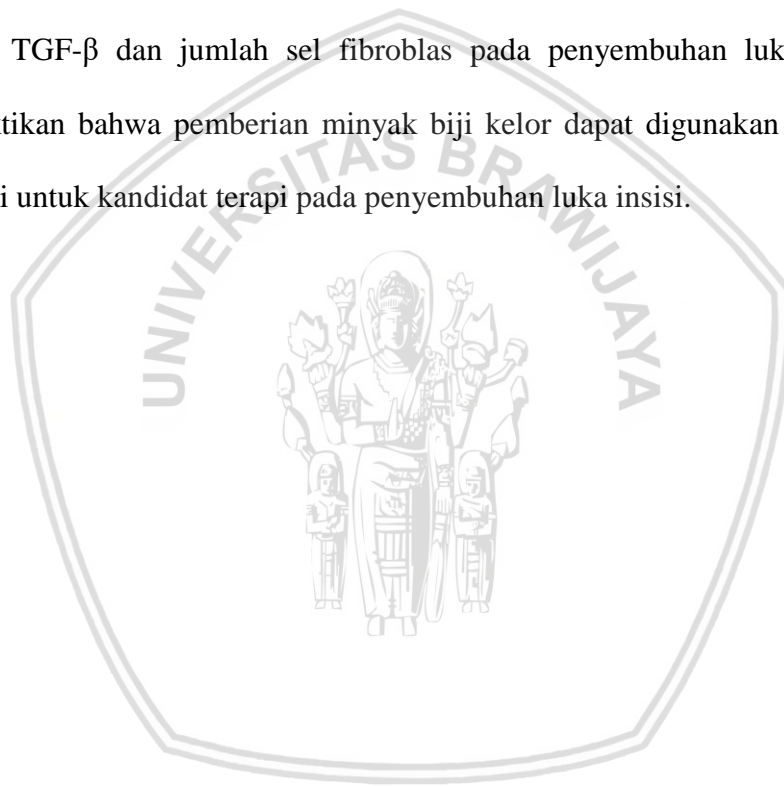
1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh pemberian minyak biji kelor secara topikal terhadap peningkatan ekspresi TGF- β berkaitan dengan penyembuhan luka insisi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

2. Mengetahui pengaruh pemberian minyak biji kelor secara topikal terhadap peningkatan jumlah fibroblas berkaitan dengan penyembuhan luka insisi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat sebagai bahan informasi penelitian selanjutnya dan untuk membuktikan pengaruh pemberian minyak biji kelor topikal terhadap ekspresi TGF- β dan jumlah sel fibroblas pada penyembuhan luka insisi dan membuktikan bahwa pemberian minyak biji kelor dapat digunakan sebagai anti inflamasi untuk kandidat terapi pada penyembuhan luka insisi.

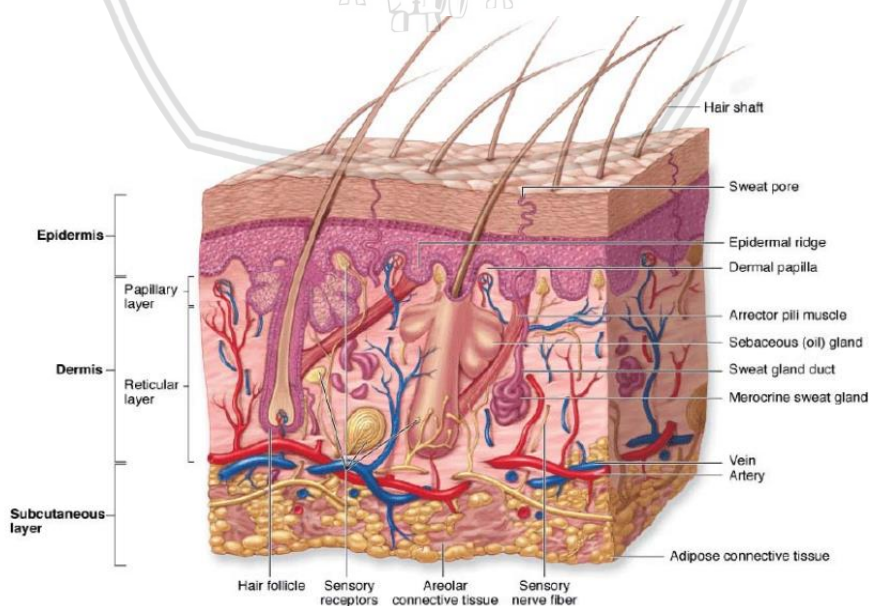


BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit

Kulit merupakan organ terbesar tubuh, menutupi sekitar 1,7 m² permukaan tubuh dan tersusun hampir 10% dari berat total tubuh. Fungsi utama kulit, yaitu menjadi pelindung tubuh dari lingkungan luar seperti radiasi sinar ultraviolet, kimia, alergen, mikroorganisme, kehilangan uap, dan nutrisi tubuh. Kulit juga berfungsi dalam proses homeostasis, mengatur suhu tubuh, dan tekanan darah (Junqueira, L. C, 1999).

Kulit tersusun atas 4 jaringan dasar yaitu epitel, jaringan ikat, otot, dan syaraf. Struktur kulit terdiri dari dua lapisan utama yaitu epidermis dan dermis (Gambar 2.1). Epidermis adalah jaringan epitel yang berasal dari ektoderm, sedangkan dermis adalah jaringan ikat agak padat yang berasal dari mesoderm. Dibawah dermis terdapat selapis jaringan ikat longgar yaitu hipodermis yang terdiri dari jaringan lemak (Kalangi, 2013).



Gambar 2.1 Lapisan kulit (Mescher, 2010)

a. Epidermis

Epidermis merupakan lapisan paling tipis dan terluar dari kulit. Epidermis terdiri atas epitel berlapis gepeng dengan lapisan tanduk. Epidermis hanya terdiri dari jaringan epitel, tidak memiliki pembuluh darah ataupun pembuluh limfe; oleh karena itu semua nutrisi dan oksigen didapatkan dari kapiler pada lapisan dermis (Kalangi, 2013).

Epitel berlapis gepeng tersusun oleh banyak lapisan sel yang disebut keratinosit. Sel keratinosit akan mengalami mitosis dalam lapis basal yang berangsur angsur bergeser ke permukaan epitel. Selama perjalanan menuju permukaan, sel-sel tersebut berdiferensiasi, membesar dan mengumpulkan filamen keratin dalam sitoplasmanya. Mendekati permukaan, sel akan mati dan dilepaskan. Waktu yang dibutuhkan oleh sel untuk mencapai permukaan adalah 20 – 30 hari. Modifikasi struktur sel selama perjalanan disebut dengan sitomorfosis. Epidermis terdiri atas 5 lapisan dari dalam ke luar yaitu, stratum basal, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lusidum, dan stratum korneum (Kalangi, 2013).

Epidermis disusun oleh 4 jenis sel, yaitu: keratinosit, melanosit, sel Langerhans, dan sel Merkel. Keratinosit adalah sel penyusun terbanyak dari epidermis (85-95%), berasal dari ektoderm permukaan dan merupakan penghasil lapisan kedap air dan perisai pelindung tubuh. Melanosit adalah penyusun epidermis sebanyak 7-10%, merupakan sel kecil dengan cabang dendritik panjang tipis dan berakhir pada keratinosit di stratum basal dan spinosum, memiliki organel pembentuk melanin yang berfungsi sebagai penahan radiasi ultraviolet.

Sel Langerhans merupakan sel dendritik yang berbentuk ireguler, ditemukan di antara keratinosit dalam stratum spinosum, dan berperan dalam respon imun kulit. Sel merkel berjumlah paling sedikit, ditemukan pada lapisan basal kulit tebal, folikel rambut, dan mukosa mulut; merupakan mekanoreseptor atau reseptor rasa sentuh (Kalangi, 2013).

b. Dermis atau Korium

Dermis atau Korium adalah lapisan tebal jaringan ikat tempat melekatnya epidermis. Dermis terletak dibawah epidermis dan dibatasi oleh lamina basalis (Perdanakusuma, 2007). Menurut Suriadi (2004), lapisan dermis lebih tebal dari pada lapisan epidermis. Fungsi utamanya sebagai penyokong epidermis. Lapisan dermis strukturnya lebih kompleks dan terdapat dua lapisan bagian *superficial papillary* dan bagian *reticular dermis*. Dermis terdiri atas stratum papilaris dan stratum retikularis, batas antara kedua lapisan tidak jelas dan serat antar lapisan saling menjalin. Jumlah sel dalam dermis relatif sedikit. Sel-sel dermis merupakan sel-sel jaringan ikat seperti fibroblas, sel lemak, sedikit makrofag dan sel mast.

Kulit berperan pada pengaturan suhu dan keseimbangan cairan elektrolit. Temperatur kulit dikontrol dengan dilatasi atau konstriksi pembuluh darah kulit. Bila temperatur meningkat terjadi vasodilatasi pembuluh darah, kemudian tubuh akan mengurangi temperatur dengan melepas panas dari kulit dengan cara mengirim sinyal kimia yang dapat meningkatkan aliran darah di kulit. Pada temperature yang menurun, pembuluh darah kulit akan vasokonstriksi yang kemudian akan mempertahankan panas (Perdanakusuma, 2007).

2.2 Luka Insisi

Luka insisi adalah rusaknya atau hilangnya kesatuan jaringan atau sebagian komponen jaringan karena teriris oleh instrumen yang tajam, misal yang terjadi akibat pembedahan. Luka ini mengakibatkan kehilangan kesinambungan dari epitel dengan atau tanpa kehilangan dari jaringan penunjangnya (Nagori, 2011). Pada saat terjadi luka, tubuh secara normal akan menimbulkan respon terhadap cedera dengan jalan proses peradangan yang dikarakteristikkan dengan adanya bengkak, kemerahan, panas, nyeri dan kerusakan fungsi (David, 2007). Luka yang tidak sembuh dalam waktu yang lama dengan berbagai etiologi dikhawatirkan mengalami komplikasi, komplikasi luka dapat menimbulkan berbagai dampak negatif (Potter dan Perry, 2006).

Luka insisi bisa dikategorikan luka akut jika proses penyembuhan berlangsung sesuai dengan kaidah penyembuhan normal tetapi bisa juga dikatakan luka kronis jika mengalami keterlambatan penyembuhan (*delayed healing*) atau jika menunjukkan tanda-tanda infeksi. Luka dikatakan akut jika penyembuhan luka dapat terjadi antara 2 sampai 3 minggu, sedangkan luka kronis adalah luka yang tidak ada tanda-tanda untuk sembuh dalam jangka lebih dari 4-6 minggu. (Zachary, 1990).

2.3 Fase Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka adalah suatu usaha untuk memperbaiki kerusakan jaringan akibat adanya cedera. Hasil penyembuhan luka yang terganggu seperti luka akut yang penanganannya terlambat dan menjadi luka kronis maka pada umumnya luka tersebut akan gagal untuk maju ke tahapan penyembuhan luka

yang normal. Ketika luka terjadi akan mengakibatkan efek seperti hilangnya seluruh atau sebagian fungsi organ dan lainnya berupa respon stress simpatis, pendarahan, pembekuan darah, kontaminasi bakteri, dan kematian sel (Gurtner, 2007).

Proses setelah luka terjadi ialah penyembuhan luka yang dapat dibagi menjadi beberapa fase yaitu fase hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan *remodeling* jaringan. Apabila terjadi luka perlu penanganan yang tepat dan benar agar tidak terjadi komplikasi misalnya infeksi, hematoma, seroma, pendarahan, dehiscence (terjadinya lubang akibat lepasnya lapisan luka operasi, yang dapat terjadi sebagian, di permukaan, atau di seluruh lapisan dengan robekan total), *evisceration* (ekstrusi alat viscera keluar dari tubuh, khususnya melalui suatu insisi bedah), dan keloid (Chrysman, 2010).

2.3.1 Fase Hemostasis

Luka dapat menyebabkan perdarahan, sehingga secara normal tubuh akan merespon untuk menghentikan perdarahan. Respon tersebut dilakukan dengan kontraksi dinding otot polos dinding pembuluh darah, sehingga dalam beberapa menit aliran darah akan berkurang dimediasi oleh penyempitan arteriol akibat dari agregasi platelet yang menyebabkan hipoksia jaringan dan asidosis. Hal tersebut akan menyebabkan peningkatan produksi oksida nitrat, adenosine, dan metabolit vasoaktif yang menyebabkan refleksi vasodilatasi dan relaksasi pembuluh arteri, secara bersamaan histamin akan keluar dari sel mast untuk meningkatkan vasodilatasi dan permeabilitas pembuluh darah, sehingga akan memfasilitasi sel inflamasi masuk ke ruang ekstraseluler luka. Dalam fase hemostasis, trombosit

memiliki peran penting untuk pembekuan darah sehingga darah yang keluar berkurang (Harper, 2014).

2.3.2 Fase Inflamasi

Fase Inflamasi berlangsung sejak terjadinya luka sampai kira-kira hari kelima, dan menjamin terjadinya homeostasis, penghilangan jaringan mati dan mencegah terjadinya infeksi invasif oleh mikroba patogen. Jaringan yang rusak dan sel mast akan melepaskan histamin dan mediator lain, sehingga menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah sekeliling yang masih utuh, serta meningkatnya penyediaan darah ke daerah tersebut. Hal ini menyebabkan daerah di sekitar luka menjadi merah dan hangat. Permeabilitas kapiler darah meningkat dan cairan yang kaya akan protein mengalir ke dalam spasium interstitial, menyebabkan edema lokal. Leukosit polimorfonuklear dan makrofag mengadakan migrasi ke dalam daerah yang rusak sebagai respon terhadap agen kemotaktik yang dipicu cedera. Leukosit polimorfonuklear dan makrofag akan melakukan pembersihan terhadap jaringan mati dan bakteri. Sel-sel tersebut dapat merangsang pembentukan Fibroblas dan angiogenesis (Morison, 2004).

2.3.3 Fase Proliferasi

Pada fase proliferasi, fibroblas meletakkan substansi dasar dan serabut-serabut kolagen. Ketika kolagen diletakkan, maka terjadi peningkatan yang cepat pada kekuatan renggangan luka. Kapiler-kapiler dibentuk oleh tunas endotelial, suatu proses yang disebut dengan angiogenesis. Bekuan fibrin yang dihasilkan pada fase 1 dikeluarkan begitu kapiler baru menyediakan enzim yang diperlukan.

Tanda-tanda inflamasi mulai berkurang. Jaringan yang dibentuk dari kapiler baru disebut dengan jaringan granulasi yang berwarna merah terang (Morison, 2004).

2.3.4 Fase Maturasi

Fase ini terjadi paling lama yaitu beberapa bulan atau tahun setelah perlukaan. Fase ini melibatkan kesinambungan antara sintesis kolagen dan degradasinya. Pada fase ini serat kolagen akan mengalami maturasi. Pada fase ini kekuatan kulit (*tensile strength*) sudah mencapai 80% dari kekuatan kulit sebelum terjadinya luka. Metabolism luka pada fase ini sudah mulai menurun sehingga angiogenesis juga mengalami penurunan (Hess, 2008).

2.4 Ekspresi TGF- β pada Penyembuhan Luka Insisi

Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) adalah sitokin polipeptida multifungsional yang disekresikan oleh berbagai sel dalam tubuh termasuk makrofag. Ekspresi TGF- β dipicu oleh infeksi atau keadaan hipoksia dan iskemia jaringan atau sel. TGF- β adalah protein yang disekresikan untuk meregulasi proliferasi, diferensiasi dan kematian sel. Semua jenis sel kekebalan seperti: sel B, sel T dan sel dendritik serta makrofag dapat mensekresi TGF- β . Fungsi penting dari TGF- β dalam sistem kekebalan tubuh adalah untuk menjaga daya tahan tubuh melalui proliferasi, diferensiasi dan aktivasi oleh sitokin lain. Selain itu, TGF- β mengontrol inisiasi dan resolusi respon inflamasi melalui regulasi kemotaksis, aktivasi limfosit, sel dendritik, makrofag, sel mast, dan granulosit. Aktivitas regulator TGF- β berfungsi mengontrol proliferasi sel dan diferensiasi sel. Secara kolektif, TGF- β menghambat perkembangan imunopatologi antigen dan mengaktifkan makrofag dalam respon inflamasi (Herpin *et al.*, 2004).

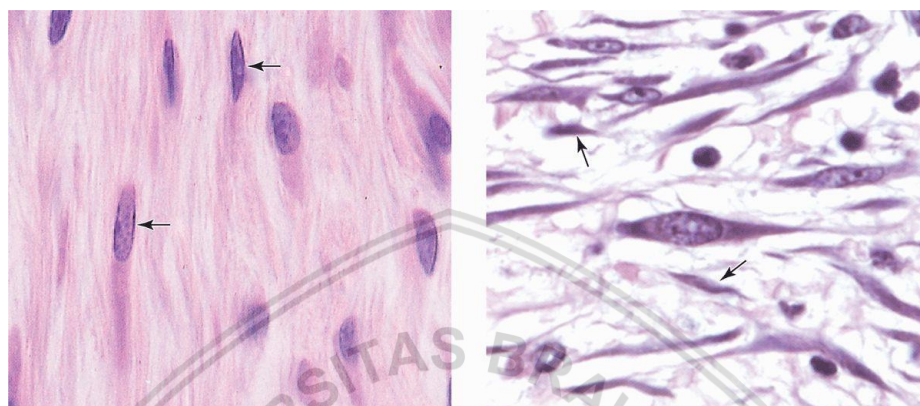
TGF- β memiliki fungsi penting dalam proliferasi dan migrasi fibroblas, meningkatkan sintesis kolagen dan fibronectin serta mengurangi degradasi atau pemecahan matriks ekstraseluler oleh *metalloproteinase*. Peran TGF- β ini sangat penting dalam penyembuhan luka. Peran TGF- β adalah sebagai faktor pertumbuhan pada proses perbaikan jaringan dan pembentukan jaringan parut. Apabila sekresinya terhambat maka akan terbentuk jaringan parut yang meluas, yang dikenal dengan sebutan keloid (*scar*). Tetapi bila sekresinya meningkat maka kolagen sebagai unsur jaringan ikat pada penyembuhan luka akan turut meningkat, sehingga luka akan sembuh lebih cepat dan lebih baik. TGF- β ini dapat terekspresi pada sel radang, fibroblas dan sel endotel yang intensitasnya bervariasi dari lemah hingga kuat (Ester dan Troef, 2012).

2.5 Fibroblas pada Penyembuhan Luka Insisi

Fibroblas terdiri dari dua kata yaitu *L. fibra* yang berarti serat dan *blatos* yang berarti benih. Fibroblas dapat didefinisikan sebagai sel yang menghasilkan serat dan substansi dasar jaringan ikat (Taqwim, 2011). Sedangkan menurut Bloom dan Fawcett (2002) fibroblas adalah sel yang menghasilkan komponen ekstrasel dari jaringan ikat yang berkembang. Fibroblas merupakan sel yang paling sering ditemui pada jaringan ikat. Fibroblas mempunyai dua aktivitas yaitu aktif dan diam. Sel yang aktif disebut dengan fibroblas sedangkan yang tidak aktif disebut fibrosit (Bloom dan Fawcett, 2002).

Fibroblas berbentuk tidak beraturan, agak gepeng dengan banyak cabang, dan dari samping terlihat bentuk gelondong atau fusiform. Sitoplasmanya bergranula halus dan mempunyai inti elips dan panjang ditengah dengan satu atau

dua anak inti jelas (**Gambar 2.2**). Fibroblas membawa banyak vakuola sitoplasmik yang berisi serat kolagen dan enzim proteolitik. Fibroblas dapat terlihat jelas dengan pewarnaan hematoksin eosin (Kusumawardhani, 2013)



Gambar 2.2 Struktur Sel Fibroblas , HE, 400x (Mescher, 2010).

Fibroblas adalah sel yang mensintesis matriks ekstraseluler dan kolagen yang berperan penting dalam penyembuhan luka. Fibroblas berfungsi mempertahankan integritas struktur jaringan ikat dengan memproduksi matriks ekstraseluler. Fibroblas memiliki sitoplasma dengan inti sel berbentuk elips dengan satu sampai dua anak inti sel. Fibroblas memproduksi kolagen, glikosaminoglikan, serat elastin dan glikoprotein yang membentuk matriks ekstraseluler. Fibrosit sebagai bentuk inaktif Fibroblas akan diinduksi oleh makrofag menjadi fibrosis pada penyembuhan luka. Fibroblas terakumulasi di daerah luka melalui angiogenesis antara dua sampai lima hari pasca cedera. Jumlah fibroblas mencapai puncaknya sekitar 1 minggu pasca trauma dan merupakan sel dominan pada minggu pertama fase penyembuhan luka (Falanga, 2004). Pada pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin*, fibroblas umumnya berkelompok membentuk suatu garis sejajar dengan

sitoplasma berwarna kemerahan dan kepadatannya diukur dengan mikrometer *graticule* pada perbesaran 400x (Kiernan, 2008).

2.6 Minyak Biji Kelor (*Moringa oleifera*) sebagai Antiinflamasi

Kelor (*Moringa oleifera*) adalah tumbuhan yang memiliki ketinggian 10-12 m dengan batang dan dahan yang rapuh berdiameter 10-45 cm. Daun berukuran kecil, berbulu dan berwarna hijau pucat. Lebar daun sekitar 0,3-0,6 cm, panjangnya 2 cm, berdaun majemuk, menyirip ganda dan berbentuk bundar kecil (Sarjono, 2008). Buah kelor berbentuk panjang menggantung, panjang 20-60 cm, buah muda berwarna hijau dan setelah tua menjadi cokelat (Gambar 2.2a), bentuk biji bulat berwarna cokelat kehitaman (Gambar 2.2b), berbuah setelah berumur 12-18 bulan (Navie dan Steve, 2010).



Gambar 2.2 Tanaman kelor (Ghebremichael, 2004).

Biji kelor mengandung asam oleat (*Ben oil*), antibiotic pterygospermin, asam lemak, tokoferol, dan fitokimia. Selain itu, biji kelor juga mengandung lemak, serat, protein, mineral, vitamin, dan asam amino. Contoh fitokimia yang terdapat pada biji kelor yaitu flavonoid yang memberikan fungsi anti-inflamasi. Antibiotik pterygospermin berfungsi sebagai agen antimikroba, dan tokoferol berfungsi sebagai antioksidan (Gopalakrishnan, 2016).

Kandungan flavonoid minyak biji kelor yang utama yaitu quersetin. Quersetin dapat dikategorikan sebagai flavonol yang merupakan salah satu subklas dari flavonoid. Quersetin berbentuk kristal jarum berwarna kuning sitrun, tidak dapat larut didalam air, namun dapat larut didalam alkohol dan lemak. Quersetin berfungsi penting sebagai anti-inflamasi dengan cara menghambat enzim siklooksigenase dan enzim lipooksigenase sehingga menurunkan jumlah prostaglandin dan leukotrien sebagai mediator inflamasi. Kerja quersetin sebagai antiinflamasi juga ditunjukkan dengan cara menghambat pelepasan histamine dari mast cell dan basophil (Kaidama, 2015). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Gopalakrishnan (2015) menunjukkan pemberian quersetin dalam penyembuhan luka dapat meningkatkan VEGF dan TGF- β , menurunkan TNF- α dan jumlah sel radang, serta meningkatkan proliferasi sel fibroblas dan memperbaiki deposisi kolagen.

Studi nutrisi dan manfaat medis dari tanaman kelor yang dilakukan oleh Gupta *et al*, 2017 menyatakan bahwa minyak biji kelor mengandung senyawa tokoferol sebagai antioksidan serta asam monopalmitat dan asam oleat yang berfungsi untuk meningkatkan aktivitas antioksidan. Ekstrak biji kelor dapat meningkatkan aktifitas antitumor dan antikanker. Buah dan biji memiliki fungsi antimikroba yang dapat melawan bakteri dan meningkatkan aktivitas *anti-fungal*. Ekstrak biji kelor juga memiliki efek anti-inflamasi, anti-arthritis, dan penyembuhan luka.

2.7 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Luka Insisi



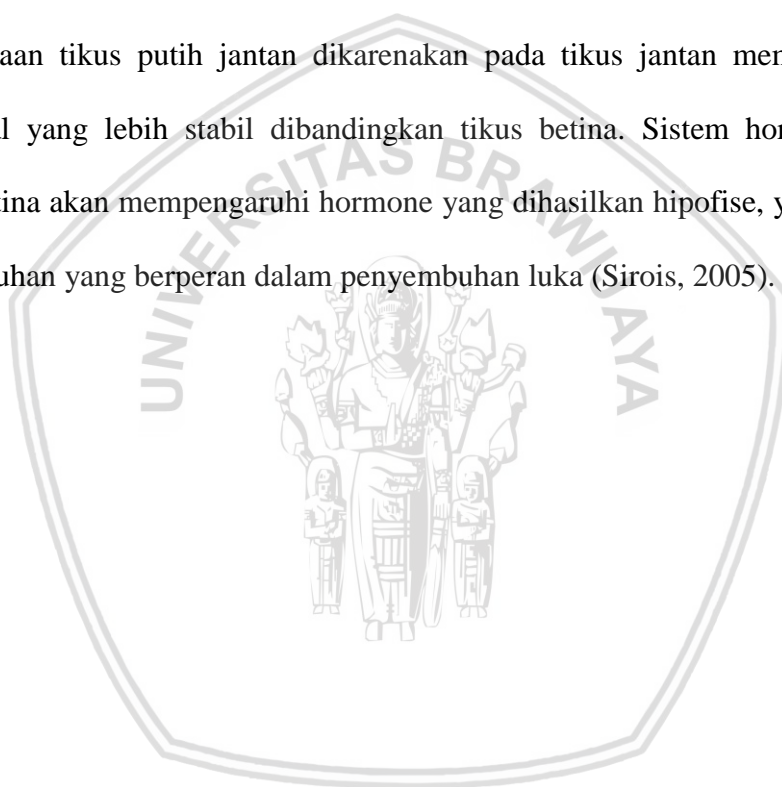
Gambar 2.3 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Sirois, 2005)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Gambar 2.3) banyak digunakan sebagai hewan percobaan pada berbagai penelitian memiliki ciri antara lain rambut berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm dan bobot tikus putih pada usia dewasa sekitar 250 – 500 gram (Potter, 2007). Tikus putih (*Rattus Norvegicus*) telah diketahui sifat-sifatnya secara baik, mudah dipelihara, dan merupakan hewan yang adaptif serta cocok untuk berbagai penelitian. Rambut tikus yang tidak tebal mempunyai beberapa keuntungan dalam penelitian yang menggunakan model perlukaan pada epidermis. Pertama, epidermis yang tidak tertutup rambut tebal tidak akan mengganggu pemisahan epidermis dari dermis; kedua, ukuran dari rambut tikus tidak terlalu tebal memudahkan terapi bahan farmakologis secara topikal dalam berpenetrasi ke kulit membuat model yang ideal untuk penilaian efek dari bahan farmakologi pada proses penyembuhan luka (Choi *et al.*, 2001).

Tikus putih yang sering digunakan untuk percobaan laboratorium ada tiga macam galur yaitu Sprague Dawley, Long Evans dan Wistar. Tikus putih memiliki beberapa sifat yang menguntungkan sebagai hewan uji penelitian di

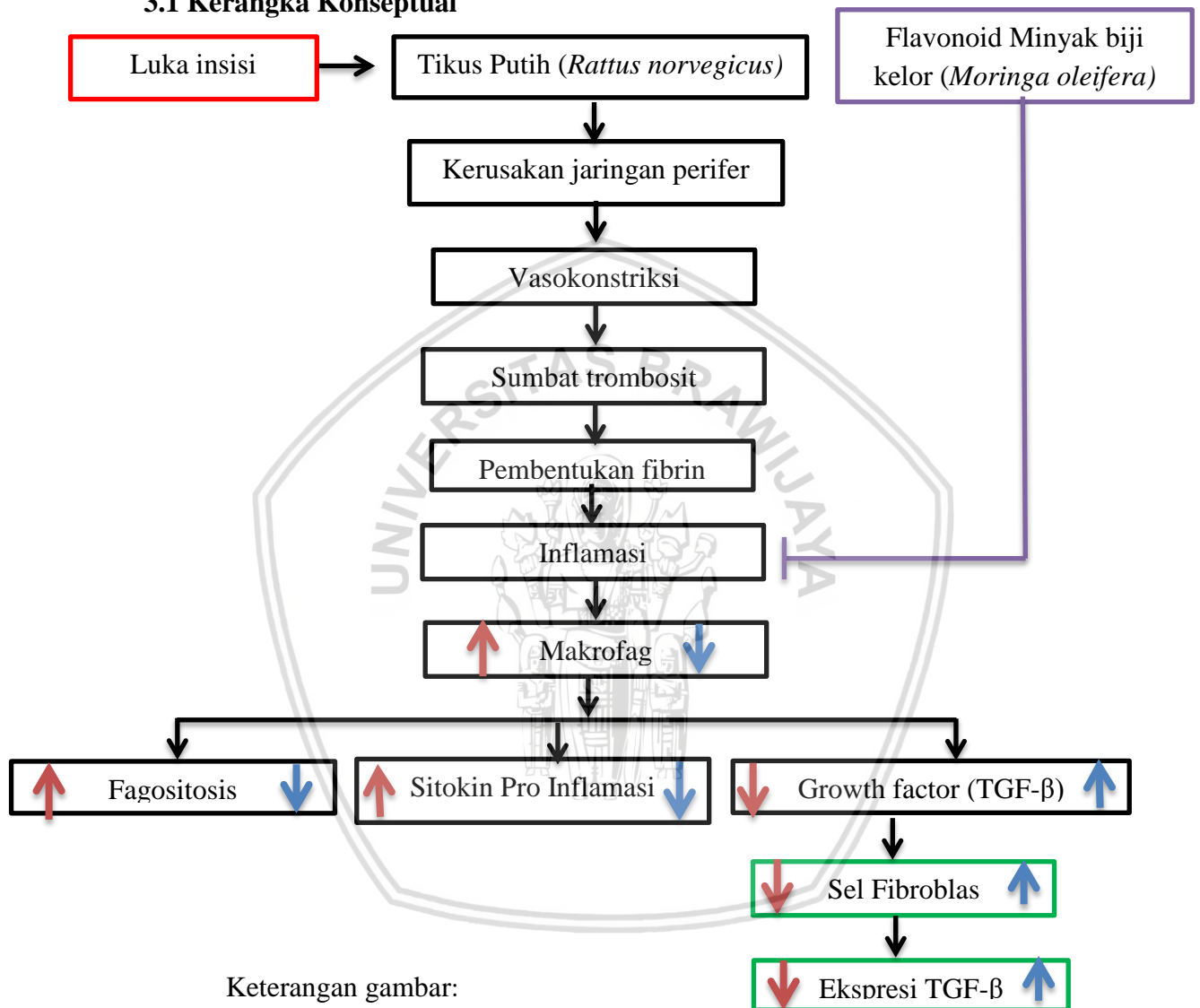
antaranya perkembangbiakan cepat, mempunyai ukuran yang lebih besar dari mencit, dan mudah dipelihara dalam jumlah yang banyak. Tikus putih juga memiliki ciri-ciri morfologis seperti albino, kepala kecil, dan ekor yang lebih panjang dibandingkan badannya (Akbar, 2010).

Dalam penelitian ini digunakan galur *Wistar* karena memiliki sistem metabolik yang mirip dengan manusia baik secara anatomi maupun fisiologi. Penggunaan tikus putih jantan dikarenakan pada tikus jantan memiliki sistem hormonal yang lebih stabil dibandingkan tikus betina. Sistem hormonal tikus putih betina akan mempengaruhi hormone yang dihasilkan hipofise, yaitu hormon pertumbuhan yang berperan dalam penyembuhan luka (Sirois, 2005).



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan gambar:

- : Luka insisi
- : Variabel bebas
- : variabel diteliti
- : jalur didalam tubuh tikus
- : menghambat
- ↑ : pengaruh perlakuan luka insisi
- ↑ : pengaruh terapi minyak biji kelor

Gambar 3.1. Kerangka Konsep Penelitian

Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberi perlakuan insisi yang menyebabkan kerusakan jaringan perifer dan diawali dengan perdarahan. Tubuh akan merespon perdarahan melalui serangkaian mekanisme hemostasis berupa vasokonstriksi, pembentukan sumbat trombosit dan pembentukan benang-benang fibrin (koagulasi darah). Kemampuan trombosit dalam mensintesis beberapa faktor pertumbuhan *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor- β* (TGF- β) serta didukung oleh sekresi beberapa mediator radang akan menginisiasi respon inflamasi. Inflamasi ditandai dengan terjadinya vasodilatasi disekitar jaringan perlukaan dan migrasi leukosit salah satunya monosit. Saat bermigrasi menuju kavitas luka, monosit akan bertransformasi menjadi makrofag. Pada fase inflamasi, makrofag akan melakukan fungsi fagositosis, melepaskan sitokin pro-inflamasi, dan mengekspresikan beberapa faktor pertumbuhan (terutama TGF- β) yang menstimulus dan memodulasi fase proliferasi.

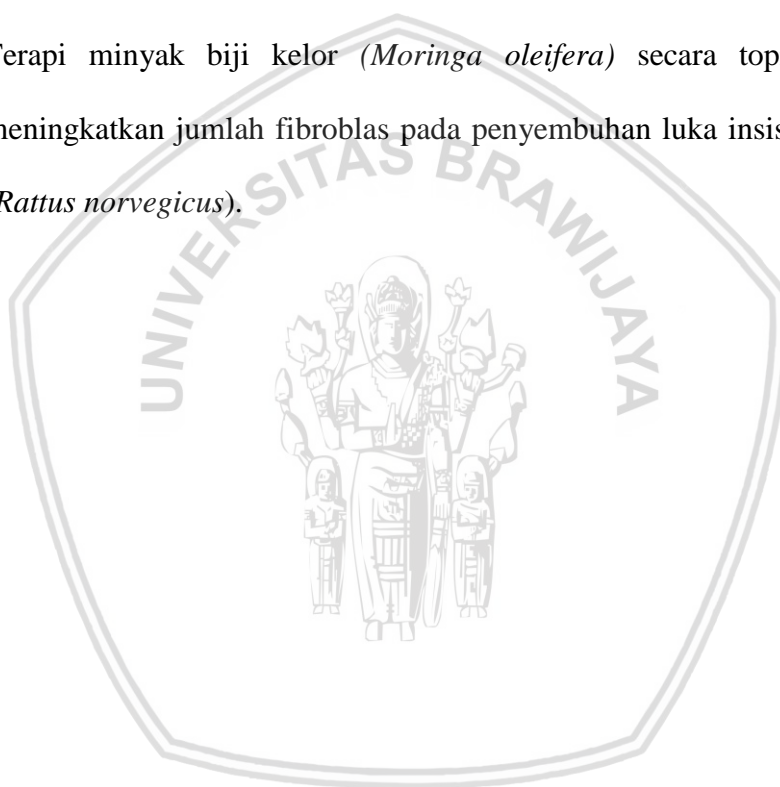
Pada fase proliferasi, sel-sel mesenkim akan terdiferensiasi menjadi fibroblas dibawah pengaruh TGF- β . Sel fibroblas akan aktif bergerak dari jaringan sekitar luka ke dalam daerah luka, kemudian akan berproliferasi serta mengeluarkan beberapa substansi (kolagen, elastin, *hyaluronic acid*, *fibronectin*, dan *proteoglycans*) yang berperan dalam rekonstruksi jaringan baru sehingga luka akan mengalami perbaikan. Proses migrasi dimulai dari tepi luka pada stratum basalis yang terletak di lapisan dermis menuju ke stratum korneum yang terletak di bagian terluar epidermis.

Kelor (*Moringa oleifera*) memiliki biji yang mengandung banyak flavonoid dan alkaloid, flavonoid ini berfungsi sebagai antiinflamasi yang dapat menurunkan sekresi sitokin proinflamasi dan merangsang peningkatan *growth factor* sehingga fase inflamasi berlangsung lebih singkat. Setelah fase inflamasi, faktor pertumbuhan seperti PDGF, FGF dan TGF β akan menstimulasi sel fibroblas yang akan mensintesis kolagen serta jaringan ikat yang menandakan penyembuhan luka memasuki fase proliferasi, pada fase proliferasi sel fibroblas akan mensintesis kolagen dalam jumlah banyak yang merupakan penyusun terbesar matriks ekstraseluler. TGF β tidak hanya diekspresikan oleh makrofag tetapi juga oleh sel fibroblas, dengan demikian saat terjadi peningkatan jumlah sel fibroblas maka ekspresi TGF β juga ikut meningkat. Tahap terakhir pada proses penyembuhan luka adalah fase maturasi. Pada fase ini matriks ekstraseluler yang dihasilkan oleh proliferasi fibroblas mengandung myofilamen dan disebut myofibroblas dimana matriks ini akan bermigrasi ke area luka dan berkontraksi yang akan membuat ukuran luka semakin mengecil dan terjadi penutupan luka. Pemberian minyak biji kelor yang mengandung flavonoid akan meningkatkan ekspresi TGF β sebagai *growth factor* yang berperan dalam proliferasi dan migrasi sel fibroblas ke daerah luka. Peningkatan proliferasi dan migrasi sel Fibroblas akan mempercepat pembentukan jaringan granulasi dan epitelisasi sehingga proses proliferasi berlangsung optimal dalam membantu proses penyembuhan luka.

3.2 Hipotesis penelitian

Berdasarkan rumusan permasalahan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Terapi minyak biji kelor (*Moringa oleifera*) secara topikal mampu meningkatkan ekspresi TGF- β pada penyembuhan luka insisi tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Terapi minyak biji kelor (*Moringa oleifera*) secara topikal mampu meningkatkan jumlah fibroblas pada penyembuhan luka insisi tikus putih (*Rattus norvegicus*).



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Januari hingga Maret 2018 dan dilakukan di beberapa laboratorium yaitu :

- a. Pemeliharaan hewan coba, pemberian perlakuan hewan coba, dan pengamatan gambaran makroskopis luka insisi terhadap terapi minyak biji kelor di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- b. Uji *Imunohistokimia* untuk pengamatan ekspresi TGF- β dan jumlah fibroblas dengan menggunakan pewarnaan HE yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain sarung tangan, spuit 1 ml, kapas, masker, *scalpel*, gunting, pinset, *object glass*, *cover glass*, pipet tetes, autoclave, timbangan, kandang tikus, botol minum tikus, dan mikroskop cahaya *Olympus BX51*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tikus putih (*Rattus norvegicus*), minyak biji kelor (*Moringa Olifera*) yang dibeli di PT. Saraswati Indo Genetech dan dideterminasi oleh UPT *Materia Medika*, NaCl fisiologis 0,9%, alkohol 70%, 80%, 90%, 100%, *Paraformaldehid* (PFA) 4%, aquades, asam asetat, hidrogen peroksida 3%, *Fetal Bovine Serum* (FBS), antibodi TGF- β ,

SA-HRP (*Strep Avidin horse radis peroxidase*), *Diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB), *dimethyl sulfoxide* (DMSO), etanol 70%, 80%, 90%, 95%, pewarnaan hematoksin eosin, parafin dan PBS pH 7,4, eter 70%, entelan, xylol, ketamin injeksi.

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba.
2. Penghitungan konsentrasi minyak biji kelor (*Moringa Oleifera*)
3. Perlakuan insisi pada hewan model tikus *Rattus Novergicus*
4. Terapi minyak biji kelor (*Moringa Oleifera*)
5. Pengukuran jumlah fibroblas dengan pewarnaan HE setelah dilakukan euthanasia dan pembuatan histopatologi kulit
6. Ekspresi TGF- β dengan metode IHK
7. Analisis Data

4.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan *Rancangan Acak Lengkap* (RAL), yang merupakan rancangan penelitian yang digunakan apabila ragam satuan percobaan yang digunakan homogen

- 1) Kelompok K⁻ (kontrol negatif) yaitu tikus normal tanpa diberi perlakuan luka insisi dan terapi minyak biji kelor (*Moringa oleifera*).
- 2) Kelompok K⁺ (kontrol positif) yaitu tikus yang diberi luka insisi tanpa terapi minyak biji kelor (*Moringa oleifera*).

- 3) Kelompok P₁ yaitu tikus diberi luka insisi dan diterapi dengan minyak biji kelor (*Moringa oleifera*) dengan konsentrasi 50%.
- 4) Kelompok P₂ yaitu tikus diberi luka insisi dan diterapi dengan minyak biji kelor (*Moringa oleifera*) dengan konsentrasi 75%.
- 5) Kelompok P₃ yaitu tikus diberi luka insisi dan diterapi dengan minyak biji kelor (*Moringa oleifera*) dengan konsentrasi 100%.

4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian

Kriteria hewan model yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus tikus jantan (*Rattus Novergicus*) dengan berat 150 - 200 gram berumur 8 - 12 minggu. Tikus tersebut diperoleh dari Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan, sehingga banyaknya perlakuan yang diperlukan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus $p(n-1) \geq 15$ (Montgomery and Kowalsky, 2011) :

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

t : Jumlah perlakuan

n : Jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 20 ekor.

4.3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- a. Variabel Bebas :Perlakuan luka insisi, pemberian terapi minyak biji kelor
- b. Variabel Terikat :Ekspresi TGF- β dan jumlah fibroblas
- c. Variabel Kontrol :Homogenitas tikus meliputi jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, dan kandang.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Persiapan Hewan Coba

Sampel penelitian yang digunakan pada penelitian ini berjumlah 20 ekor tikus tikus jantan (*Rattus Novergicus*) dengan berat 150 – 200 gram. tikus diadaptasi selama tujuh hari sebelum digunakan untuk penelitian. Menurut Muliani (2011), hewan coba diberi minum ad libitum dan pakan berbentuk pelet sebanyak 10% berat badan setiap pagi dan sore. Pakan diberikan sebanyak 3 g per hari. Hewan coba terdiri dari lima kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok terdiri dari empat ekor tikus dalam satu kandang. Kandang tikus berbahan plastik dengan tutup kawat dan diberi alas berupa sekam kayu agar kandang tidak lembab.

4.4.2 Pembuatan Luka Insisi pada Hewan Coba

Dilakukan anastesi pada kelompok hewan coba menggunakan ketamin dengan dosis 30 mg/kg BB dan Xylazine dengan dosis 3 mg/kg BB secara intramuscular. Dilakukan pencukuran dibagian dorsal hewan coba hingga bersih, lalu didesinfeksi menggunakan alkohol 70%. Setelah tikus tidak sadar, dilakukan

insisi pada daerah punggung dengan panjang 2 cm. Pembuatan insisi dilakukan hanya sampai subkutan sehingga tidak menembus muskulus.

4.4.3 Terapi Minyak Biji Kelor

Pemberian minyak dilakukan dua kali sehari dengan cara mengoleskannya pada area luka selama tujuh hari kemudian dilakukan penutupan menggunakan kasa steril yang ditutup dengan hypafix. Setiap hari dilakukan pengamatan terhadap penyembuhan luka secara makroskopis yaitu warna, panjang luka, dan pembentukan debris.

4.4.4 Euthanasia dan Isolasi Kulit

Pengambilan jaringan kulit dilakukan pada hari ke-8, dilakukan euthanasia terlebih dahulu pada hewan coba dengan cara dislokasi cervicalis. Tikus diposisikan rebah ventral untuk proses pengambilan jaringan kulit yang telah diberi perlukaan dan terapi. Sebelum pengambilan jaringan kulit, daerah sekitar luka dibersihkan dari rambut yang mulai tumbuh kembali, kulit diambil pada bagian luka dan 2 mm kulit normal disekitar luka. Kulit yang diambil kemudian difiksasi dengan larutan Buffer Neutral Formalin atau BNF 10% dibiarkan pada suhu kamar selama ± 48 jam

4.4.5 Perhitungan Jumlah Fibroblas

4.4.5.1 Pembuatan Preparat Histologi dan Pewarnaan HE

Pembuatan preparat histopatologi meliputi proses fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi parafin, *embedding*, *sectioning*, dan penempelan pada *object glass*. Fiksasi dilakukan untuk mencegah kerusakan dan mengawetkan jaringan dengan cara dimasukkan ke dalam larutan formaldehid. Dehidrasi dilakukan untuk

mengeluarkan air dari jaringan yang difiksasi sehingga dapat diisi dengan parafin. Dehidrasi menggunakan larutan etanol bertingkat yaitu 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 2 jam, dan etanol 90%, 95% selama 20 menit. Proses penjernihan dilakukan untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dengan menggunakan xylol I selama 20 menit dan xylol II selama 30 menit. Proses infiltrasi dan *embedding* dilakukan dalam parafin cair sampai memadat. Proses *embedding* bertujuan untuk mengeluarkan cairan penjernih dan diganti dengan parafin. Penggunaan parafin bertujuan untuk memadatkan jaringan kulit agar mudah dipotong. Kulit dibenamkan ke dalam paraffin/paraplast I selama 2 jam, kemudian dipindahkan ke dalam paraffin/paraplast II selama 1 jam Jaringan dipotong dengan ketebalan ± 5 μm . hasil irisan dipindahkan ke dalam air hangat pada suhu 39-40°C. Irisan organ diambil menggunakan *object glass* kemudian disimpan dalam inkubator dengan suhu 38-40°C selama 24 jam.

Jaringan yang telah diiris dengan ketebalan tertentu selanjutnya dapat diwarnai dengan pewarna HE. Zat warna hematoxilin berfungsi untuk memberi warna biru pada inti sel. Sedangkan eosin akan memberi warna merah muda pada sitoplasma sel. Proses pewarnaan diawali dengan proses deparafinasi, rehidrasi, dan *clearing*. Tahap akhir setelah pewarnaan selesai maka dilanjutkan dengan proses mounting menggunakan entelan dan kemudian ditutup menggunakan *cover glass* (Balqis dkk., 2014).

Sel fibroblas berbentuk gelendong dan fusiform, memiliki satu inti atau lebih, bersifat basofilik, dan berwarna ungu pucat pada pewarnaan *hematoxyline eosin*. Sel fibroblas diamati di lapisan kulit dermis (Bloom dan Fawcett, 2002).

Perhitungan jumlah sel fibroblas dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel fibroblas pada lima pandang berbeda di bagian insisi menggunakan mikroskop cahaya *Olympus* seri BX51. Setelah itu hasil pengamatan difoto. Hasil foto dari mikroskop kemudian diproses menggunakan *software ImageRaster* perbesaran 40x lensa objektif. Hasil pengamatan jumlah sel fibroblas pada masing masing sampel dirata-rata dan dibandingkan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (Kartikaningtyas dkk., 2015).

4.4.6 Ekspresi TGF- β dengan Metode Imunohistokimia (IHK)

Metode imunohistokimia dilakukan dengan cara preparat kulit direndam ke dalam xylol I, xylol II, alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%), aquades masing-masing selama 5 menit kemudian preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Preparat ditetesi 3% H₂O₂ selama 20 menit. Dicuci kembali dengan PBS Ph 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diblok dengan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 5% dalam PBS selama 30 menit dengan suhu ruang. Kemudian preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diinkubasi dengan antibody primer selama 1 jam dengan suhu ruang dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Berikutnya preparat diinkubasi dengan antibody sekunder selama 1 jam dengan suhu ruang. Preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali.

Preparat ditetesi dengan *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) selama 40 menit. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Ditetesi dengan Diamano benzydine (DAB) selama 10 menit.

Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya dilakukan *counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 10 menit. Dicuci dengan air mengalir, dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Tahapan terakhir adalah dilakukan mounting dengan entellan dan ditutup dengan cover glass.

Ekspresi TGF- β dapat diamati pada bagian sitoplasma sel fibroblas pada lapisan dermis yang berwarna kecoklatan. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop BX51 perbesaran 400x dengan lima bidang pandang pengamatan. Setelah itu hasil pengamatan difoto dan diproses menggunakan *software axiovision* untuk mengamati peningkatan ekspresi TGF- β yang ditandai dengan peningkatan persentase luas daerah yang terwarnai

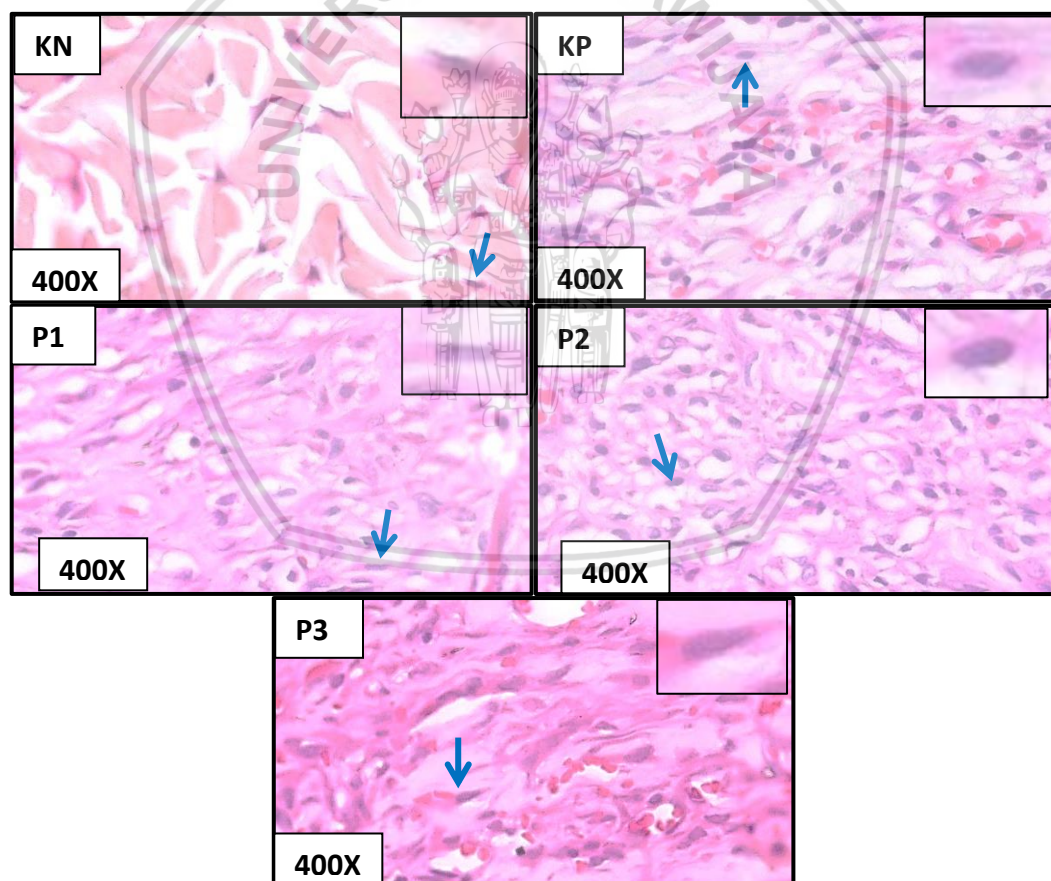
4.5 Analisis Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah jumlah fibroblas dan ekspresi TGF- β yang dianalisis secara kuantitatif menggunakan Microsoft Excel dan SPSS for windows dengan analisis statistik ragam One Way ANOVA untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan antar kelompok penelitian. Jika terdapat perbedaan maka dilakukan uji lanjutan yaitu Uji Tukey $\alpha=0,05$. Uji Tukey digunakan untuk mengetahui suatu kelompok dengan kelompok lainnya memiliki pengaruh yang sama atau berbeda (Firdaus dkk., 2013).

BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Minyak Biji Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Jumlah Sel Fibroblas pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Luka Insisi

Hasil penelitian pengaruh pemberian minyak biji kelor terhadap jumlah sel fibroblas dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) disajikan pada **Gambar 5.1**. Gambaran mikroskopis lapisan dermis, terlihat sel fibroblas tersebar pada jaringan ikat dibagian dermis, sel fibroblas memiliki inti berbentuk elips dan berwarna ungu.



Gambar 5.2 Histopatologi dermis hari ke-8 (HE, 400x).

Keterangan : **KN.** Tikus kontrol negatif, **KP.** tikus kontrol positif, **P1** tikus diterapi minyak biji kelor 50%, **P2** tikus diterapi minyak biji kelor 75%, **P3** tikus terapi minyak biji kelor 100%. Inti sel fibroblas ditunjukkan dengan panah biru

Perhitungan jumlah sel fibroblas dilakukan pada setiap ulangan kelompok pada semua lapang pandang menggunakan *counter*. Data yang diperoleh dianalisa secara statistik menggunakan *software* SPSS metode *One Way ANOVA* dilanjutkan dengan uji Tukey dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil perhitungan rata-rata jumlah total sel fibroblas disajikan pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Hasil perhitungan rata-rata jumlah sel fibroblas hari ke-8

Kelompok	Rata-rata Jumlah Total Sel Fibroblas	Peningkatan terhadap KP	Peningkatan terhadap KN
KN (Kontrol Negatif)	258.75±9.63 ^a	-	-
KP (Kontrol Positif)	416.75±18.58 ^b	-	48,33%
P1 (Terapi Minyak Biji Kelor 50%)	565.75±17.17 ^c	35,75%	118,64%
P2 (Terapi Minyak Biji Kelor 75%)	1023.50±24.28 ^e	145,59%	295,55%
P3 (Terapi Minyak Biji Kelor 100%)	711.75±17.38 ^d	70,78%	175,07%

Keterangan: Perbedaan notasi menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok

Hasil pengamatan pada kelompok kontrol negatif (**Gambar 5.1.KN**) terlihat jaringan dermis kulit normal dengan susunan jaringan ikat agak renggang dan sedikit terdapat fibroblas. Berdasarkan hasil uji tukey didapatkan rata-rata jumlah total fibroblas kelompok kontrol negatif sebesar $258,75 \pm 9,63^a$ yang digunakan sebagai standar kondisi jaringan normal. Jumlah sel fibroblas pada kulit normal hanya sedikit dikarenakan tidak adanya kerusakan jaringan ikat atau proses inflamasi sehingga tidak terdapat peningkatan jumlah fibroblas . Fibroblas pada kulit normal berfungsi untuk mensintesis sebagian besar substansi dasar ECM termasuk kolagen dan elastin yang berguna untuk mempertahankan bentuk organ tubuh termasuk kulit (Mescher, 2010).

Perlakuan kelompok kontrol positif yaitu tikus yang diinsisi tanpa diberikan terapi minyak biji kelor menunjukkan jumlah fibroblas di lapisan dermis mengalami peningkatan disertai pertumbuhan jaringan ikat (**Gambar 5.1.KP**). Berdasarkan hasil perhitungan, peningkatan rata-rata jumlah sel fibroblas pada kelompok kontrol positif yaitu sebesar 416 ± 18.58^b (**Tabel 5.1**), hasil tersebut menunjukkan perbedaan nyata apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yaitu adanya perbedaan notasi dan peningkatan sebesar 48,33%. Peningkatan jumlah sel fibroblas pada kelompok kontrol positif dikarenakan adanya perlakuan luka insisi yang menyebabkan jaringan mengalami serangkaian proses perbaikan yang ditandai dengan adanya migrasi dan proliferasi fibroblas di jaringan luka. Sel fibroblas mengalami proliferasi sejak 24 jam setelah luka dan menunjukkan peningkatan jumlah pada hari ke-3 yang merupakan hari terakhir dari fase inflamasi menuju ke fase proliferasi. Peningkatan jumlah sel fibroblas terus berlangsung hingga puncak fase proliferasi yakni hari ke-7 sampai hari ke-10.

Hasil pengamatan secara mikroskopis lapisan dermis kelompok P1 menunjukkan banyaknya pertumbuhan sel fibroblas, serta jaringan ikat tersusun rapat (**Gambar 5.1.P1**). Perhitungan rata-rata jumlah total sel fibroblas kelompok P1 ($565,75 \pm 17,17^c$) yang diterapi dengan minyak biji kelor konsentrasi 50% menunjukkan perbedaan nyata dengan rata-rata kelompok kontrol positif (KP), namun memiliki nilai rata-rata jumlah total sel fibroblas yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok P2 ($1023,5 \pm 24,28^e$) dan P3 ($711,75 \pm 17,38^d$) hal ini disebabkan karena pada konsentrasi 50% memiliki kandungan flavonoid yang

lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi 75% dan 100% sehingga pengaruh yang ditimbulkan konsentrasi 50% dalam meningkatkan jumlah fibroblas tidak lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi 75% dan 100%. Kerja quarsetin dari minyak biji kelor yaitu dengan cara menekan jumlah mediator inflamasi dan meningkatkan proliferasi fibroblas .

Gambaran mikroskopis lapisan dermis kelompok P2 menunjukkan pertumbuhan sel fibroblas yang sangat banyak diikuti dengan pertumbuhan jaringan ikat, sel fibroblas dan jaringan ikat tersusun dengan rapi (**Gambar 5.1.P2**). Hasil perhitungan rata-rata jumlah total sel fibroblas pada kelompok P2 ($1023,5 \pm 24,28^e$) menunjukkan perbedaan signifikan terhadap kelompok kontrol positif (KP) yaitu adanya peningkatan sebesar 162,41% (**Tabel 5.1**). Kelompok P2 yang diterapi dengan konsentrasi 75% merupakan kelompok terapi dengan dosis optimal karena menunjukkan peningkatan jumlah fibroblas yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini sesuai dengan Gopalakrishnan (2015) yang menyatakan bahwa pemberian quarsetin dengan dosis yang tepat dapat meningkatkan ekspresi VEGF dan TGF- β , menurunkan mediator inflamasi TNF- α dan sel radang, diikuti dengan meningkatnya proliferasi sel fibroblas .

Hasil pengamatan secara mikroskopis lapisan dermis kelompok P3 menunjukkan banyaknya pertumbuhan sel fibroblas , serta jaringan ikat tersusun sangat rapat (**Gambar 5.1.P3**). Perhitungan rata-rata jumlah total sel fibroblas kelompok P3 ($711,75 \pm 17,38^d$) yang diterapi dengan minyak biji kelor konsentrasi 100% menunjukkan perbedaan nyata dibandingkan rata-rata kelompok kontrol

positif (KP), namun memiliki nilai rata-rata jumlah total sel fibroblas yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok P2 ($1023,5 \pm 24,28^\circ$) hal ini sesuai dengan penelitian Mayers (1995), yang menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi dosis menyebabkan kelebihan oksidasi (*pro oksidan*) dan didalam pro oksidan terdapat OH yang bisa menyebabkan kerusakan sel yang berujung kematian sel, sehingga proses kesembuhan luka terhambat. Serta hal ini disebabkan karena penggunaan minyak murni tanpa pengenceran memiliki tingkat kekentalan yang tinggi, sehingga kurang dapat terserap secara sempurna di kulit.

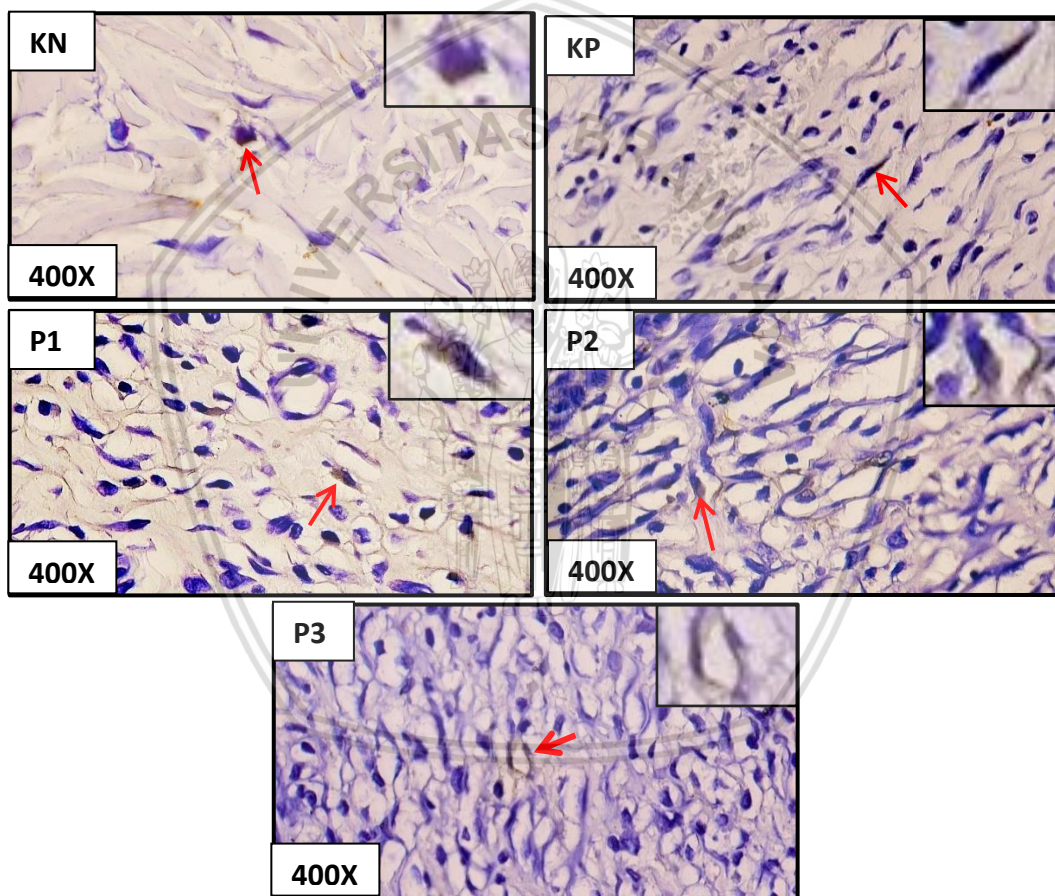
Hasil pengamatan pada hari ke-8 menunjukan rata-rata jumlah total sel fibroblas pada kelompok perlakuan baik P1, P2, maupun P3 yang diterapi dengan minyak biji kelor memiliki perbedaan nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (KP) (**Tabel 5.1**), hal ini membuktikan bahwa pemberian terapi minyak biji kelor efektif dalam meningkatkan jumlah sel fibroblas sehingga dapat mengoptimalkan fase proliferasi dalam penyembuhan luka. Minyak biji kelor efektif digunakan untuk penyembuhan luka karena mengandung flavonoid sebagai antiinflamasi, pterigospermin sebagai antimikroba, dan tokoferol sebagai antioksidan (Gopalakrishnan, 2016). Flavonoid yang terkandung dalam minyak biji kelor diantaranya adalah quersetin yang berfungsi untuk menurunkan sekresi sitokin proinflamasi dan meningkatkan ekspresi dari faktor pertumbuhan sehingga meningkatkan pula proliferasi fibroblas, hal ini menyebabkan proses inflamasi berlangsung lebih cepat, dan proses proliferasi berlangsung lebih optimal. Tokoferol atau vitamin E berfungsi sebagai antioksidan yang membantu mempercepat fase proliferasi sehingga migrasi dan proliferasi sel-sel epidermal

tidak terhambat oleh kehadiran radikal bebas berlebih yang tidak bisa dinetralisir oleh antioksidan endogen yang ada (Prasetyo dkk., 2010).

Berdasarkan jumlah fibroblas yang telah dihitung dan diuji statistika, kelompok P2 merupakan dosis paling efektif pada penelitian ini untuk meningkatkan jumlah sel fibroblas berdasarkan jumlah sel fibroblas yang paling banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain, dan memiliki perbedaan yang signifikan terhadap seluruh kelompok. Semakin meningkatnya jumlah sel fibroblas pada fase proliferasi menandakan proses penyembuhan luka yang lebih baik. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pemberian terapi minyak biji kelor konsentrasi 75% pada luka insisi memiliki efek dalam meningkatkan jumlah sel fibroblas pada hari ke 7 yang merupakan puncak fase proliferasi. Dengan meningkatnya jumlah fibroblas pada hari ke 7 yang merupakan fase puncak proliferasi, diharapkan luka dapat segera menutup karena fungsi fibroblas dalam menghasilkan kolagen dan membentuk substansi ECM serta perannya sebagai myofibroblas dalam kontraksi luka.

5.2 Pengaruh Pemberian Minyak Biji Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Ekspresi TGF- β pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Luka Insisi

Hasil ekspresi TGF- β pada kulit tikus model luka insisi dengan teknik imunohistokimia ditunjukkan dengan adanya ekspresi warna kecoklatan pada bagian sitoplasma sel fibroblas dan sel makrofag yang dapat dilihat pada **Gambar 5.2**.



Gambar 5.2 Immunohistokimia ekspresi TGF- β hari ke-8 (400x).

Keterangan : **KN.** Tikus kontrol negatif, **KP.** tikus kontrol positif, **P1** tikus diterapi minyak biji kelor 50%, **P2** tikus diterapi minyak biji kelor 75%, **P3** tikus terapi minyak biji kelor 100%. Ekspresi TGF- β divisualisasikan melalui pembentukan warna coklat pada sitoplasma sel fibroblas (ditunjukkan dengan panah merah).

Ekspresi TGF- β pada masing-masing perlakuan ditandai dengan terbentuknya warna kecoklatan pada sitoplasma sel fibroblas di lapisan dermis kulit (**Gambar 5.2**). Warna kecoklatan tersebut menggambarkan adanya ikatan antigen pada jaringan dengan antibody TGF- β yang digunakan pada penelitian ini.

Pengukuran presentase area ekspresi TGF- β dilakukan dengan menggunakan software imunoratio dan didapatkan jumlah rata-rata ekspresi TGF- β pada **Tabel 5.2**. Data yang diperoleh kemudian diuji statistik dengan menggunakan *one way* ANOVA dengan hasil uji statistik pada **Lampiran 9**.

Tabel 5.2. Data Ekspresi TGF- β hari ke 8

Kelompok	Rata-rata Ekspresi TGF- β (%)	Peningkatan terhadap KP	Penurunan terhadap KN
K- (Kontrol Negatif)	10.30 \pm 1.18 ^b	-	-
K+ (Kontrol Positif)	7.05 \pm 1.21 ^a	-	34,41%
P1 (Terapi Minyak Biji Kelor 50%)	13.25 \pm 1.13 ^c	87,94%	-
P2 (Terapi Minyak Biji Kelor 75%)	18.50 \pm 0.90 ^d	162,41%	-
P3(Terapi Minyak Biji Kelor 100%)	14.00 \pm 1.41 ^c	98,68%	-

Keterangan: Perbedaan notasi menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok

Berdasarkan **Tabel 5.2**, diketahui bahwa rata-rata ekspresi TGF- β pada tikus kontrol negatif (KN) yang tidak diberikan perlakuan insisi adalah 10.30 \pm 1.18^b. Hal tersebut membuktikan bahwa faktor pertumbuhan ini diekspresikan dalam kondisi kulit normal. Menurut Guanqun, (2005), TGF- β berperan penting dalam menjaga homeostasis jaringan dengan meregulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel serta deposisi ECM. Pada kondisi fisiologis terjadi apoptosis atau kematian sel yang terprogram, dengan demikian diperlukan peranan faktor pertumbuhan guna meregulasi sel-sel yang telah mati tersebut.

Hasil analisa stastistika menunjukkan bahwa perlakuan luka insisi pada tikus kelompok kontrol positif menunjukkan ekspresi TGF- β dengan rata-rata 7.05 ± 1.21^a yang digunakan sebagai standar untuk mengetahui adanya peningkatan atau penurunan ekspresi TGF- β pada kelompok perlakuan lainnya. Kelompok kontrol positif menunjukkan penurunan rata-rata ekspresi TGF- β dari kelompok negatif (KN) hal ini dapat disebabkan karena luka pada kontrol positif masih berada pada fase inflamasi, sehingga banyak terkespresi mediator inflamasi dan sedikit terdapat growth factor.

Kelompok P1 yaitu tikus yang diinsisi dan diberikan terapi minyak biji kelor 50% menunjukkan rata-rata ekspresi TGF- β yang berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif (KP) yaitu adanya peningkatan sebesar 87,94%. Namun tidak berbeda nyata dengan kelompok P3 yang diterapi dengan minyak biji kelor konsentrasi 100%. Hal ini berarti kelompok P1 mampu meningkatkan ekspresi TGF- β namun memiliki pengaruh yang sama dengan kelompok P3.

Kelompok P2 yaitu tikus yang diinsisi dan diberikan terapi minyak biji kelor 75% menunjukan perbedaan nyata dengan kelompok kontrol positif (KP) dengan peningkatan sebesar 162,41%. Kelompok P2 menunjukan peningkatan signifikan terhadap kontrol positif dan kontrol negatif. Peningkatan ekspresi TGF- β pada kelompok perlakuan 2 lebih tinggi daripada kelompok P1 dan P3, hal ini menunjukkan bahwa kelompok P2 memiliki pengaruh yang lebih baik dalam meningkatkan ekspresi TGF- β dibandingkan dengan kelompok P1 dan P3.

Kelompok P3 yaitu tikus yang diinsisi dan diberikan terapi minyak biji kelor 100% menunjukkan perbedaan nyata dengan kelompok kontrol positif (KP)

dengan peningkatan sebesar 98,68% namun tidak berbeda nyata dengan kelompok P1, hal ini menunjukkan bahwa pemberian minyak biji kelor konsentrasi 50% dan konsentrasi 100% memiliki pengaruh yang sama dalam meningkatkan ekspresi TGF- β .

Berdasarkan **Tabel 5.2.**, Ekspresi TGF- β pada semua kelompok perlakuan diantaranya kelompok P1(13.25 ± 1.13^c), P2(18.50 ± 0.90^d), dan P3(14.00 ± 1.41^c) mengalami peningkatan signifikan apabila dibandingkan dengan kontrol negatif (10.30 ± 1.18^b) dan kontrol positif (7.05 ± 1.21^a). Peningkatan presentase pada kelompok perlakuan tersebut membuktikan bahwa pemberian minyak biji kelor efektif dalam mempercepat fase inflamasi dan meningkatkan ekspresi TGF- β sehingga dapat mengoptimalkan fase proliferasi dalam penyembuhan luka. Hal ini didukung oleh pendapat Manan (2015) yang menyatakan minyak biji kelor mengandung banyak senyawa fenol, diantaranya adalah senyawa flavonoid yaitu quercetin dan katekin yang berfungsi sebagai antiinflamasi. Sesuai dengan penelitian Gopalakrishnan (2016) Quercetin mampu meningkatkan VEGF dan TGF- β 1 secara signifikan, dan mengurangi jumlah sitokin proinflamasi serta sel radang, selain itu, quercetin meningkatkan proliferasi fibroblas dan menghasilkan reepitelisasi yang lebih baik serta memperbaiki deposisi kolagen sehingga dapat membantu penyembuhan luka.

Selain mengandung senyawa antiinflamasi, minyak biji kelor juga mengandung senyawa antimikroba yaitu pterigospermin yang berfungsi untuk membunuh mikroba atau bakteri sehingga luka tidak mengalami infeksi. Kandungan Vitamin E yang tinggi pada minyak biji kelor berfungsi sebagai

antioksidan yang mencegah kerusakan endotel yang menyebabkan hipoksia. Pada keadaan hipoksia akan merangsang regulator TGF- β sehingga ekspresi TGF- β akan mengalami peningkatan. Pada fase proliferasi ekspresi TGF- β akan banyak muncul karena perannya dalam proses angiogenesis. Adanya faktor pertumbuhan seperti TGF- β pada fase proliferasi akan merekrut fibroblas, keratinosit, dan sel endotel untuk mengisi jaringan yang luka (Brun, 2006).

Ekspresi TGF- β pada kelompok P2 mengalami peningkatan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 dan 3. Hal ini dapat diakibatkan pada kelompok P1 jumlah senyawa kimia yang terkandung kurang bekerja optimal dalam penyembuhan luka. Pada kelompok P3 didapatkan hasil rata-rata ekspresi TGF- β yang lebih rendah daripada P2 karena penggunaan minyak murni memiliki viskositas yang lebih tinggi daripada minyak yang diencerkan sehingga proses penyerapan tidak lebih lama dan tidak efektif, selain itu, menurut penelitian Mayers (1995), menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi dosis menyebabkan kelebihan oksidasi (*pro oksidan*) dan didalam pro oksidan terdapat OH yang bisa menyebabkan kerusakan sel yang berujung kematian sel, sehingga proses kesembuhan luka terhambat.

Berdasarkan rata-rata ekspresi TGF- β dan jumlah sel fibroblas serta ditunjang dengan perhitungan statistika dan gambaran makroskopis (**Lampiran 7**), dapat disimpulkan bahwa kelompok P2 merupakan dosis yang paling efektif untuk meningkatkan rata-rata ekspresi TGF- β dan jumlah sel fibroblas, juga ditunjukkan secara makroskopis dengan ukuran luka yang mengecil dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Keadaan ini menunjukkan terjadinya proses

penyembuhan luka yang lebih baik. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pemberian terapi menggunakan minyak biji kelor dengan konsentrasi 75% pada luka insisi memiliki efek paling efektif dalam menaikkan rata-rata ekspresi TGF- β dan jumlah sel fibroblas sehingga mengoptimalkan fase proliferasi dalam proses penyembuhan luka insisi.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian terapi minyak biji kelor (*Moringa oleifera*) pada tikus model luka insisi dapat meningkatkan jumlah sel fibroblas pada proses kesembuhan luka dengan dosis terapi paling efektif pada penelitian ini adalah konsentrasi 75%
2. Pemberian terapi minyak biji kelor (*Moringa oleifera*) pada tikus model luka insisi dapat meningkatkan ekspresi TGF- β pada proses kesembuhan luka dengan dosis terapi paling efektif pada penelitian ini adalah konsentrasi 75%.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka saran yang dapat diberikan yaitu :

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh minyak biji kelor hingga fase remodeling.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh minyak biji kelor untuk terapi luka insisi pada hewan lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Bahan Antifertilitas*. Adabia Press. Jakarta.
- Balqis, U., Rasmaidar, dan Marwiyah. 2014. Gambaran Histopatologi Penyembuhan Luka Bakar Menggunakan Daun Kedondong (*Spondias dulcis F.*) dan Minyak Kelapa pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Medika Veterinaria*, 8(1): 31-36.
- Bloom, W., D. W. Fawcett. 2002. *Buku Ajar Histologi*. Edisi 12. Terjemahan Jan Tambayong. Jakarta: EGC.
- Brun-Buisson, C. 2006. The Epidemiology F Systemic Inflammation Respon. *Intensive Care Medicine*, 26: 64-74.
- Choi, S.W., B.W. Son, Y.S. Son, Y.I. Park, S.K. Lee and M.H. Chung. 2001. The wound-healing effect of glycoprotein fraction isolated from Aloe vera. *British Journal of Dermatology*, 145(4): 535-545.
- Chrysman, C. A. 2010. Care of chronic wounds in palliative care and end-of-life patients. *International Wound Journal*, 7(4): 214-35.
- David, P.S. 2007. *Anatomi Fisiologi Kulit dan Penyembuhan Luka*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Ester, A.N.I.S., dan T. Soemarmo. 2012. *Pengaruh Pemberian Low-Level Laser Therapy pada Proses Penyembuhan Luka Bakar Derajat II*. Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya.
- Falanga V, Kerdel FA. 2004. Split-thickness Skin Grafting of Leg Ulcers. The University of Miami Department of Dermatology's Experience. *Dermatology Surgery*, 21: 701.
- Firdaus, M.F.P., S.P. Madyawati., N.S Widjaja., M. Lamid., K. Rachmawati, dan S.H. Warsito. 2013. Efektivitas Penambahan Kombinasi Tujuh Enzim terhadap Estimasi Pertambahan Berat Badan Sapi Potong Peranakan Simental. *Jurnal Agroveteriner*, 2(1): 3.
- Ghebremichael, K. A. 2004. Moringa Seed and Pumice as Alternative Natural Materials for Drinking Water Treatment. *Land and Water Resources Engineering*, 5: 10-11.

- Gopalakrishnan, A., M. Ram., S. Kumawat., SK. Tandan., D. Kumar. 2016. Quercetin Accelerated Cutaneous Wound Healing in Rats by Increasing levels of VEGF and TGF- β 1. *Indian Journal of Experimental Biology*, 54: 187-195
- Gopalakrishnan, L., K. Doriya., D.S. Kumar. 2016. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*, 5: 49-56
- Guanqun, A., S.Lu,G.Han, M.Kulesz-Martin, and X.J Wang. 2005. Current View of the Role of Transforming Growth Factor β 1 in Skin Carcinogenesis. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 10(2): 110
- Gupta, S., R. Jaina., S. Kachhwahab., S.L. Kothar. 2017. Nutritional and medicinal applications of *Moringa oleifera* Lam.—Review of current status and future possibilities. *Journal of Herbal Medicine*.
- Gurtner, G.C. 2007. Wound healing, normal and abnormal. In: Thorne CH, Beasley, R.W., Aston, S.J., Bartlett, S.P., Gurtner, G.C., Spear, S.L. (Eds). *Grabb and Smith's plastic surgery*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 15-22.
- Harper, D., A. Young, and C. E. McNaught. 2014. *The Physiology of Wound Healing*. Elsevier Surgery
- Herpin, A., C. Lelong, and P. Favrel. 2004. Transforming Growth Factor-Beta Related Proteins an ancestral and Widespread Superfamily of Cytokines in Metazoans. *Journal of Developmental and Comparative Immunology*, 28(5) : 461-485.
- Hess, C. T. 2008. *Clinical Guide to Skin and Wound Care 6th Edition*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Junqueira, L. C. 1999. *Histologi Dasar (Basic Histology)*, edisi kedelapan. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta, 357-359.
- Kalangi, S. J. R. 2013. Histofisiologi Kulit. *Jurnal Biomedik*, 5(3): 12-20.
- Kartikaningtyas, A. T., Prayitno, dan S.P. Lastiany. 2015. *Pengaruh Aplikasi Gel Ekstrak Kulit Citrus Sinensis terhadap Epitelisasi pada Penyembuhan Luka Gingiva Tikus Sprague Dawley*. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Gadjah Mada: Yogyakarta.

- Kiernan, J.A. 2008. *Histological and histochemical methods: theory and practice*. 4th ed. Bloxham, UK: Scion.
- Kristianto, H. 2010. Perbandingan Perawatan Luka Teknik Modern dan Konvensional terhadap Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- β 1) dan Respon Nyeri pada Luka Diabetes Melitus [tesis]. Fakultas Ilmu Keperawatan. Universitas Indonesia.
- Luqman S., Suchita S., Ritesh K., Anil K. M., Debabrata C. 2010. Experimental Assessment of Moringan oleifera Leaf and Fruit for Its Antistress, Antioxidant, and Scavenging Potential Using InVitro and InVivo Assays. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-12.
- Manan, Abd., Fazilah and M. Sulaiman. 2015. Analysis of total phenolics, tannins and flavonoids from moringa oleifera seed extract. *Journal Of Chemical And Pharmaceutical Research*, 7(1): 132-135.
- Mescher, A.L. 2010. *Junquiera's Basic Histology, Twelfth Edition*. The McGraw-Hill Companies, Inc. USA. 96-98.
- Mori H.M. H. Kawanami. H. Kawahata and M. Aoki. 2016. Wound Healing Potential of Lavender Oil by Acceleration of Granulation and Wound Contraction Through Induction of TGF- β in a Rat Model. *Jurnal BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(144).
- Morison, M. J. 2004. *Manajemen Luka*. EGC. Jakarta.
- Muliani , H. 2011. Pertumbuhan Mencit (*Mus musculus L.*) Setelah Pemberian Biji Jarak Pagar (*Jathropa curcas L.*). Jurusan Biologi FMIPA UNDIP. Semarang. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 19(1).
- Nagori, B. D. dan R. Solanki. 2011. Role of Medicinal Plants in Wound Healing. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5(4): 392-405.
- Navie, Sheldon and Steve, Csurhes. 2010. *Horseradish tree: Moringan Oleifera*. Queensland Government.
- Perdanakusuma, D.S. 2007. *Anatomi Fisiologi Kulit Dan Penyembuhan Luka*. Surabaya: Airlangga University School Of Medicine – Dr. Soetomo General Hospital.1-8.
- Potter, W.P. 2007 *Rats and Mice: Introduction and Use in Research Health Sciences Center for Educational Resources*. University of Washington.

- Potter, P.A., dan Perry, A. G.. 2006. *Buku Ajar Fundamental Keperawatan: Konsep, Proses, Dan Praktik, edisi 4, Volume.2*. Jakarta: EGC.
- Prasetyo, B.F., W. Ietje., B.P. Priosoeryanto. 2010. Aktivitas Sediaan Gel Ekstrak Batang Pohon pisang Ambon dalam Proses Penyembuhan Luka pada Mencit. *Jurnal Veteriner*, 11(2): 70-73.
- Rairisti, A. 2014. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca cateuchul*) terhadap Penyembuhan Luka Sayat Pada Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) Jantan galur Wistar [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Tanjung Pura. Pontianak.
- Sarjono, H. T. 2008. Penggunaan Tepung Daun Kelor (*Moringa oleifera Lam*) dalam Pakan terhadap Presentasi Karkas, Presentase Deposisi Daging Dada, Persentase Lemak Abdominal dan Kolesterol Daging Ayam Pedaging [Skripsi]. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Elsevier Press. Washington.
- Suriadi. 2004. *Perawatan Luka Edisi I*. CV. Sagung Seto. Jakarta.
- Triyono, B. 2006. Perbedaan Tampilan Kolagen Di Sekitar Luka Incisi pada Tikus Wistar yang Diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupivakain dan yang Tidak Diberi Levobupivakain [Tesis]. Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro: Semarang.
- Wajdi A.S., Kasmiyati S., Hastuti P.S. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Campuran Ekstrak Biji Kelor (*Moringa oleifera*) dan Daun Kersen (*Muntingia calabura*) terhadap *Pseudomonas aeruginoso* dan *Bacillus subtili*. *Jurnal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 2: 10-15.
- Zachary, C. B. 1990. *Basic Cutaneous Surgery, A Primer in Technique*. Churchill Livingstone.